

時間と共に離合集散を繰り返す分子機械のX線小角散乱・動的構造解析

秋山 修志

名古屋大学大学院理学研究科

1. 研究のねらい

タンパク質や核酸といった生体高分子がひしめく細胞内、そこは非常に複雑な環境である。それら生体高分子を個々に取り出し、その構造や機能を詳細に調べる技術を我々は確立しつつある。一方で、「生命体の部品に焦点を絞った研究」だけでは、ときに生命現象の解明に不十分な場合がある。例えば、コンデンサー、コイル、抵抗といった個々の電気素子に精通していても、それら3つが電気回路として組織化されたときに生じる正弦型の減衰振動電流を予測することは容易でない(図1B)。同様に、タンパク質や遺伝子に関する個々の知識は、多様な生体高分子が渾然一体となった細胞内で起こる“生きた現象”を予測するための十分条件ではない。分子の数や種類が1つ、2つ、3つと増えて自己組織化が進むにつれ、系は単純な足し合わせで説明しづらくなり、やがて予測もつかないような時間的・空間的パターンが観察されるようになる(図1A)。まさしくこれが生きた姿(生命)であり、生物時計はその典型的な例である。

地球に生息する生命の多くは精巧な生物時計を備えており、時計が発振する概日リズム(約24時間周期のリズム)を指針に、代謝・光合成といった生命活動を昼夜環境サイクルに同調させている。生物時計の特徴として、(1)自律的な概日リズムの発振、(2)光による位相のリセット機構、(3)周期が温度に依存しないこと(温度補償性)の3つが挙げられる。シアノバクテリアは3要件を満たす生物時計を備えた生命体であり、その時計は時計遺伝子群(*kai*)から発現される3つの時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC で構成される(Ishiura *et al.*, 1998)。時計の振り子に相当するのが KaiC であり、KaiA は KaiC のリン酸化を促進し、KaiB は KaiA の働きを抑制する(KaiC の脱リン酸化を促す)。3つの時計タンパク質と ATP を混合すると KaiC のリン酸化状態が概日周期で変動し(図2)、シアノバクテリアの生物時計を試験管内で再構成することができる(Nakajima *et al.*, 2005)。

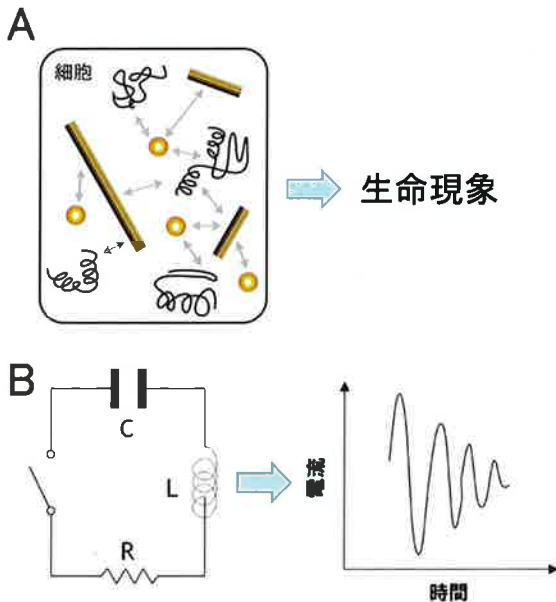


図1 複雑さのなかに潜む秩序ある生命現象
A: 細胞中にはタンパク質や核酸といった生体高分子が混在しており、それらの相互作用を通して種々の生命現象が発現される。B: コイル(L)、コンデンサー(C)、抵抗(R)でネットワーク(直列回路)を作ると、減衰型の振動電流が観察される。

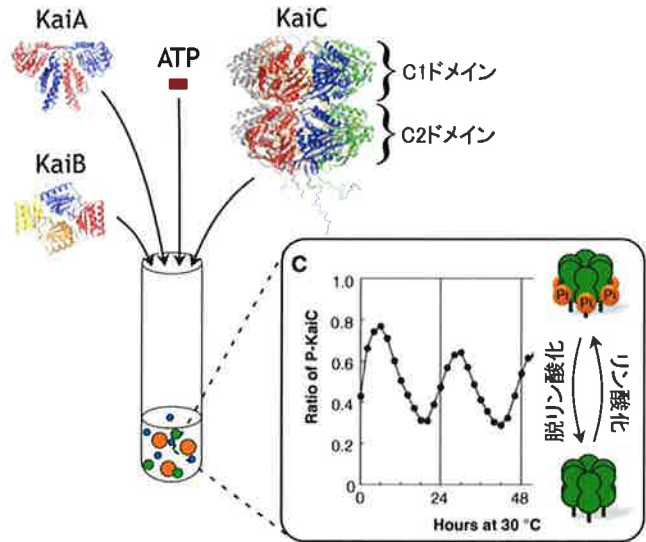


図2 シアノバクテリア生物時計の再構成
結晶構造によると、KaiAは33 kDaのポリペプチド鎖×2本(赤、青)から、KaiBは11 kDa×4本(赤、青、黄、橙)から、KaiCは58 kDa×6本(赤、青、緑、黄、橙、灰)から構成されている。3種類の Kai タンパク質と ATP を混合すると、KaiC はリン酸化型(+ P)と脱リン酸化型の状態を概日周期で往來する(図はNakajima *et al.* *Science*, 308, 414-415 (2005)より一部改変のうえ掲載)。

「3種類のタンパク質とわずかなエネルギーで時を刻む」という驚くべき生命現象を解明するため、Kaiタンパク質の構造解析が精力的に進められている (Johnson *et al.*, 2004). 既に個々のKaiタンパク質について結晶構造が報告されており (図2), 時計を作る歯車 (時計を構成するタンパク質) の構造は既知である. しかし, 歯車どうしの噛み合い (複合体構造), それらの時間発展 (ダイナミクス) が解明されていないため, 時を刻む機構を深く理解するには至っていない.

KaiAがKaiCのリン酸化を促進し, KaiBがKaiCの脱リン酸化を促進することからも, ATPを消費しつつ2種類の分子間相互作用を巧みに切り替えることが, 時計を駆動する機構の核心部分であると推測される. よって, Kaiタンパク質複合体の構造解析が切望されるが, 大きさ・形を時間変化させる離合集散系を, 従来の構造生物学的手法のみで解明することは難しい. 例えば, ダイナミクス計測に長けたNMRは大変魅力的であるが, 分子量350 kDaにも達するKaiCの信号を分離して記録するのは容易でない. X線結晶構造解析を行うためには, 離合集散するKaiタンパク質複合体を何らかの方法で補足・結晶化する必要がある (図3A).

A X線結晶構造解析

(3次元的に整列した分子)



B X線小角散乱

(溶液中で自由に動く分子)



図3 X線結晶構造解析とX線小角散乱の相補的利用

A: X線結晶構造解析の概念図。分子(歯車)を結晶化することができれば高分解能構造が期待できる。一方, 得られるのは静的な構造であり, 時分割測定ができる系は極めて限定される。B: X線小角散乱の概念図。生理的な溶液中で複合体の滴定実験(歯車の噛み合わせ)や時分割測定が可能である。一方, 得られる空間分解能は低く, 一般的に分子形状程度である。X線小角散乱とX線結晶構造を相補的に利用すれば, 各部品が複合体内に占める位置・配向を決定できる。

溶液状のタンパク質試料を扱うX線小角散乱は, X線結晶構造解析と相補的な関係にある (図3B). 結晶化が不要なため試料や実験条件への制限は低くなるが, その代償として, 空間分解能は分子形状程度にまで低下する. しかしKaiタンパク質の場合, 個々の結晶構造は既に明らかとされている (図2). よって, X線小角散乱で調べた複合体の形状に既存の結晶構造を当てはめることで (図3B), 分子間相互作用の切り替え機構が検証できる. これにより, KaiCのリン酸化状態と複合体形成の関係を視覚的に説明・理解することを目指す. また, 本申請研究を通じてX線小角散乱の測定・解析技術を向上させ, 離合集散を繰り返す生命現象を解明するための計測分析技術として有用であることを実証したい.

2. 研究成果

最初に, Kaiタンパク質3種の離合集散ダイナミクスを丁寧に計測した. KaiA, KaiB, KaiCをATPと混合して反応を開始させ, 各測定時刻に一定量の試料を反応溶液より抽出した. その一部をX線小角散乱測定に, 残りをKaiCリン酸化状態の定量に使用した. 入射X線と同方向に散乱さ

れたX線の強度 $I(0)$ は、試料の重量平均分子量に比例するため、Kai タンパク質の会合状態や蓄積量の変化に敏感である。 $I(0)$ は劇的に変化し、 24.4 ± 0.2 h の周期で力強く振動することが明らかとなった(図4・○)。この結果は、KaiC のリン酸化状態と同様に(図4・□)、Kai タンパク質間の相互作用もまた概日振動していることを示しており、溶液中でタンパク質が離合集散することを直接的に証明する実験データである。

次に、2 種間相互作用 (KaiAC, KaiBC, KaiAB 複合体) に焦点を当てた研究を行い、複雑な3 種間相互作用を解明するためのデータを収集した。一定量のKaiCに様々な量のKaiA (もしくはKaiB) を混合し、30 度で十分に平衡化させた後にX線小角散乱測定を行った。系に加えたKaiA全濃度に対して $I(0)$ をプロットしたところ(図5A・□)、 $I(0)$ は初めに急激な増加を示し、そのあと滑らかな曲線を描きつつ緩やかな単調増加へと至った。一方、KaiBとKaiCの組み合わせでは(図5A・○)、 $I(0)$ は急勾配の直線的増加の後、約 $4 \mu\text{M}$ (~1 当量) のKaiB濃度で鋭い屈曲点を生じて飽和に達した。これら滴定曲線の解析から、KaiAとKaiCの解離定数 (K_d) が $4.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 、KaiBとKaiCの組み合わせでは $K_d = 0.12 \pm 0.08 \mu\text{M}$ と求められ、結合比はともに1 対1となった。以上の結果は、KaiBCの相互作用がKaiACの組み合わせよりも約40 倍強いことを示す。また、同様の実験をKaiAとKaiBの組み合わせで行い、直接的な2 者間相互作用がないことを確認した。

1 対1 結合モデルと K_d に基づいて複合体の散乱曲線を見積り、各々の散乱曲線を説明する低分解能モデルを構築した。KaiAC複合体は $150 \times 150 \times 110 \text{ \AA}$ の大きさからなる。KaiCは全体積の80% を占め(図5B・青色)、球状の頭部と短い尾部で構成される。興味深いことに、頭部の中央には空洞が観察され、KaiCの結晶構造を一意的にフィットすることができた。KaiCの頭部はC1 とC2 と呼ばれるドメインで構成されており、KaiAに相当する残り20%の電子密度(図5B・橙色)はC2ドメインと尾部近傍に局在化していた。KaiBC複合体は $140 \times 130 \times 100 \text{ \AA}$ の寸法からなり、KaiAC複合体よりもわずかにコンパクトであった。KaiAC複合体と同様にKaiCに特徴的な電子密度(図5C・緑色)が確認でき、全体積の13%にあたるKaiBの電子密度(図5B・紫色)はC2ドメインと相互作用していることが示された。

2 種間および3 種間相互作用の計測データを用い、3つの歯車が何時どのように噛み合わさって機能するかを詳しく検証した。実験データを最も矛盾なく説明することができたのは、図6に示されるような反応サイクルであった。重要な知見の一つは、KaiCと相互作用を形成するタイミングがKaiAとKaiBで大きく異なり、両者の性質がウサギとカメのように対照的である点である。KaiAは勢いよくスタートダッシュを切ってKaiCへと結合し、速やかにKaiCをリン酸化するが(図6-1)、KaiBはリン酸化が終了した頃に遅れてやってきてKaiCと結合し(図6-4a, 4b)、徐々に脱リン酸化しつつKaiCより解離する(図6-5a, 5b)。 $I(0)$ の位相がKaiCリン酸化状態の位相より4分の1周期遅れていた理由は(図4)、このような対照的な相互作用に起因し

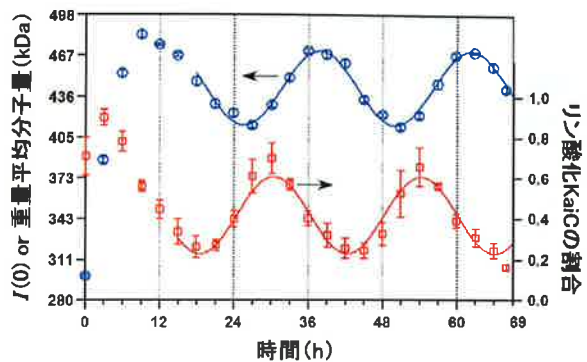


図4 Kai タンパク質の離合集散と KaiC リン酸化状態
生理的モル比で KaiA, KaiB, KaiC を混合し、リン酸化 KaiC の割合(□)を SDS-PAGE で、原点散乱強度 $I(0)$ (○) を X線小角散乱で定量した。 $I(0)$ は試料の重量平均分子量に比例する。

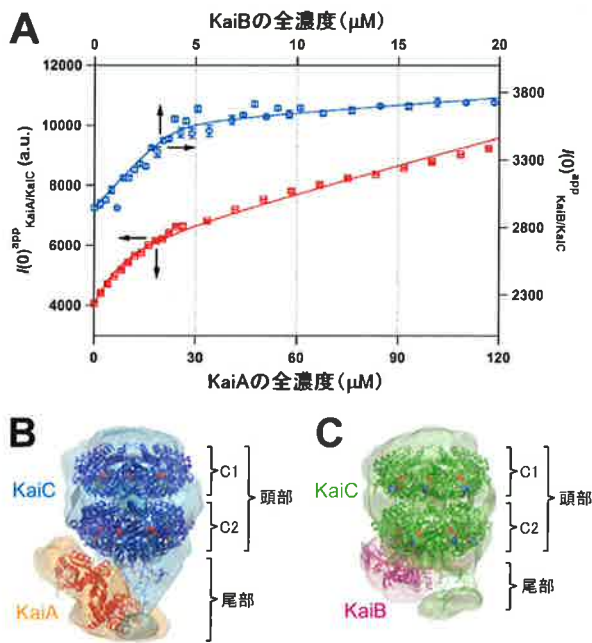


図5 Kai タンパク質複合体の X線小角散乱モデル

A : X線小角散乱を用いた滴定実験。一定量の KaiC に KaiA(□)もしくは KaiB(○)を滴定し、 $I(0)$ の変化を追跡した。実線は1 対1 結合モデルの理論曲線を示す。B : KaiAC 複合体の低分解能モデル。図中、リボンモデルは小角散乱モデルに当てはめたX線結晶構造を表す。C : KaiBC 複合体の小角散乱モデル。

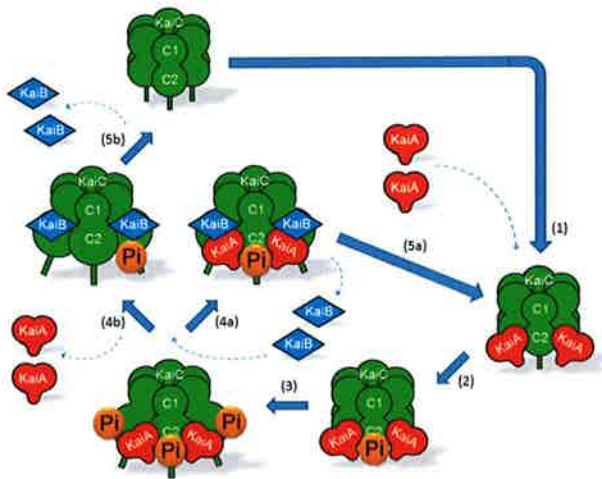


図6 Kai タンパク質の離合集散モデルの概略

(1) 脱リン酸化 KaiC へ KaiA が結合する。(2~3) KaiC がリン酸化される。(4a) KaiAC 複合体に KaiB が結合し, KaiABC 複合体が形成される。(4b) KaiAC 複合体に KaiB が接近し, 結合していた KaiA と入れ替わって KaiBC 複合体を形成する。(5a~5b) KaiC が脱リン酸化された後, KaiB が解離する。

反応系路上に枝分かれが存在することを示唆し, KaiBC と KaiABC 複合体が同時期に蓄積するという生化学研究の結果に構造的基盤を与えるものである。

X線小角散乱を用いた本研究により, 複合体構造と離合集散ダイナミクスが可視化され, Kai タンパク質が時を刻む機構の一端が明らかとなった。今後, $I(0)$ だけでなく散乱曲線全体を利用した実験と解析を進め, 発振機構がより詳細に解明されるよう努めたい。

3. 主な発表

論文

- Akiyama S., Nohara A., Ito K. and Maéda Y. "Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome", *Molecular Cell*, 29, 703-716 (2008).
- Akiyama S. "Assembly and Disassembly of Cyanobacterial Clock Proteins Studied by Real-time Small-angle X-ray Scattering", *Journal of the Japanese Society for Synchrotron Radiation Research*, in press (2008).
- Inaba K., Suzuki M., Maegawa K., Akiyama S., Ito K. and Akiyama Y. "A Pair of Circularly Permuted PDZ Domains Control RSEP, The S2P Family Intermembrane Protease of E. Coli", *Journal of Biological Chemistry*, in press (2008).

招待講演

- Akiyama S., "Real-time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Complexes of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins", 9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation, Manchester Bridgewater Hall, Manchester, UK, Aug. 12-16 (2007).
- Akiyama S., "Real-time Small-Angle X-ray Scattering Study of Assembly and Disassembly Cycles of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins", 2008 Meeting of the American Crystallographic Association, Knoxville, USA, May 31-June 5, 2008.

4. 受賞

- XIII International Conference on Small-angle Scattering (2006年7月) 2006 SAS Young Scientist Prize 受賞
- 日本生物物理学会 若手奨励賞受賞 (2007年12月)
- 文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞 (2008年4月)

ている。

もう一つの発見は, KaiA と KaiB の切り替え機構である。最初に KaiAC 複合体が生じ(図 6-1), KaiC が十分にリン酸化を受けた後に KaiB がやってくるが, X線小角散乱モデルは 2通りのシナリオを示唆する。1つは KaiB が KaiA の近傍に結合し(図 6-4a), KaiABC 複合体を形成して KaiA を阻害する場合である。もう一つの可能性は(図 6-4b), KaiB が KaiA を押しつけて入れ替わる可能性である。複合体モデルをよく観察すると, KaiC に対する結合位置が KaiA と KaiB で類似している(図 5B, C)。KaiBC 複合体は KaiAC 複合体よりも安定であるため, 図 6-4b の反応は熱力学的に十分可能である。

KaiABC 複合体, KaiB C 複合体の状態では共に KaiA の機能が抑制されている。脱リン酸化が進行した後に KaiB が解離し(5a, 5b), サイクルは元に戻る。我々の実験データは,